Dal BOLLETTINO DELLA SOCIETÀ DI BIOLOGIA SPERIMENTALE
Vol. I. fas. V, 1926.
SEZIONE DI TORINO. Seduta del 5 luglio 1926.

SULLA RIPRESA DELLA ATTIVITÀ RITMICA CONTRATTILE SPONTANEA DI FRAMMENTI DI CUORE DI PULCINO COLTIVATI « IN VITRO ».

Del Dott. O. OLIVO.

(Dall' Istituto di Anatomia della R. Università di Torino, diretto dal Prof. G. Levi.)

Quando si eseguiscono colture *in vitro* di frammenti di cuore embrionale, si osserva che tali frammenti continuano a pulsare ritmicamente per parecchi giorni (almeno 15 o più). Quando l' esperimento dura più giorni, si rinnova il mezzo di coltura ogni 2° o 3° giorno secondo la tecnica dei successivi trapianti fatti su vetrino copri-oggetti, descritta da CARREL. La capacità contrattile è massima nei frammenti di cuore prelevati da embrioni molto precoci (2°-3° giorno di incubazione) ed è dovuta al grande automatismo proprio di ogni singola parte del cuore in questi stadii; essa si mantiene notevole fino al 7°-8° giorno di incubazione, per poi decrescere sensibilmente (graduale perdita dell' automatismo ed aumento dell' eccitabilità). Dopo il 10°-12° giorno d' incubazione diventa sempre più difficile osservare contrazioni spontanee; in frammenti di cuore (si tratta sempre del ventricolo) dopo il 15° giorno non ho mai osservato contrazioni spontanee. Quanto ho detto si riferisce a colture fatte in plasma diluito con soluzione di RINGER.

Eseguendo gli stessi preparati in un mezzo di coltura composto in parti eguali di plasma e succo embrionale, si osservano contrazioni spontanee soltanto negli embrioni più giovani, e anche in questi per un periodo di tempo più breve di quando sono coltivati in solo plasma e soluzione fisiologica. In un primo tempo, però, tale cessazione delle pulsazioni spontanee dipende soltanto dalla modificata composizione del mezzo di coltura, che ne impedisce la manifestazione, pur non essendo scomparsa nei pezzi la capacità contrattile; basta infatti lavare i preparati in soluzione di RINGER per alcuni minuti, per ridestare in essi le contrazioni ritmiche spontanee.

Però dopo alcuni giorni (6–8 al massimo per cuore di 7-8 giorni) la capacità contrattile è definitivamente scomparsa. La ragione di questo fatto sta nell' azione del succo embrionale che ha determinato in tutti gli elementi muscolari una completa sdifferenziazione morfologica, accompagnata da perdita della capacità funzionale.

Un processo analogo di sdifferenzazione si può ottenere pure in frammenti di cuori più inoltrati (embrioni di 17 giorni e pulcini di 24 ore e di 6 giorni). In questi frammenti, che non si contraggono mai spontaneamente nei primi giorni di coltura, e in cui la struttura delle fibre si avvicina già molto alla struttura delle fibre del cuore di adulto, si ottiene dapprima la scomparsa completa delle miofibrille, ma i mioblasti sono ancora ben riconoscibili come tali per alcuni caratteri istologici, e in secondo tempo va perdendosi ogni differenza citologica tra mioblasti e fibroblasti.

Era perciò interessante verificare se, durante tale processo di sdifferenziazione, gli elementi contrattili si riaccostavano funzionalmente agli elementi embrionali meno evoluti, se riprendeva cioè in essi valore l' automatismo sull' eccitabilità. Ed è quanto ho potuto dimostrare. Tanto i frammenti di cuore d' embrione al 17° giorno di incubazione quanto quelli di pulcino di 24 ore e di 6 giorni, dopo 4-6 giorni di coltura in plasma e succo embrionale, si mettono tutti a pulsare spontaneamente, ritmicamente, se lavati in soluzione di RINGER o rinnovati in plasma e soluzione fisiologica. Fissati e studiati sulle sezioni microtomiche, in questo momento si constata la scomparsa delle miofibrille; ciò si può controllare pure nel vivente, saggiando l' azione del cloruro di calcio che determina contrazioni dissociate quando vi sono miofibrille, azione che viene a mancare in questi preparati.

Prolungando più giorni la coltivazione in plasma e succo embrionale, la capacità contrattile scompare definitivamente perchè, come nei cuori più giovani, anche in questi la sdifferenzazione è andata tanto avanti da rendere i mioblasti strutturalmente e funzionalmente indifferenti.

Gli stessi frammenti, coltivati per controllo in plasma e soluzione di RINGER sino dall' inizio, dànno risultato diverso: soltanto i frammenti di cuore embrionale di 17 giorni possono riprendere a pulsare (risultato inconstante) dopo 6, 8 o più giorni; ciò è possibile, perchè, anche senza succo embrionale, si ottiene un certo grado di sdifferenziazione, la quale procede però più lentamente e incompiutamente. Dopo la nascita, invece, i frammenti non riprendono a pulsare, perchè

in assenza di succo embrionale le fibre degenerano rapidamente, prima che in esse si sia ottenuto il grado di sdifferenziazione degli elementi cardiaci necessario a far ridestare l' automatismo.

Il fatto che i frammenti di cuore di pollo, coltivati in plasma e succo embrionale, riacquistano la capacità contrattile spontanea nelle condizioni delle colture *in vitro*, quando in essi sono distrutte le miofibrille, fa ritenere che il meccanismo della funzione automatica delle contrazioni cardiache embrionali abbia sede nel sacroplasma.

Conclusioni.—Frammenti di cuore embrionale di pollo di varia età e di pulcini dei primi giorni dopo la schiusa, se coltivati *in vitro*, in mezzo composto di plasma e succo embrionale, vanno incontro a un processo di sdifferenziazione morfologica per cui le fibre si trasformano in elementi indifferenti, percorrendo in certa maniera a ritroso il cammino già fatto durante il processo di differenziazione.

Al fatto morfologico è intimamente connesso un fatto funzionale: quando ogni carattere strutturale specifico è scomparso, è scomparsa pure la capacità funzionale specifica; ma, poichè la sdifferenziazione procede gradualmente, prima di arrivare a ciò, nei frammenti cardiaci vediamo che, in uno stadio intermedio della loro sdifferenziazione, l' attività contrattile assume caratteri proprii dei cuori di embrioni più giovani; ciò ci rende pure ragione del fatto che i frammenti dei cuori più adulti, che nelle ordinarie condizioni di coltura non pulsano per la loro grande eccitabilità e scarsa autonomia e automatismo (stato funzionale dovuto alla grande differenziazione istologica subita), riprendono a pulsare spontaneamente ritmicamente dopo qualche giorno di coltura, come l' abbozzo cardiaco dei primi giorni di incubazione. Tale capacità contrattile, che si ridesta in questi frammenti in modo spontaneo, ed è ritmica e automatica, ha sede nel sacroplasma, come le prime contrazioni cardiache, poichè il materiale fibrillare è andato distrutto durante la sdifferenziazione.